

## 壳聚糖-聚酰胺法组合纯化甜叶菊废渣中黄酮\*

罗序燕,方浩斌,赵东方,黄瑞宇,邓金梅,祝婷,谢小华

(江西理工大学 冶金与化学工程学院,江西 赣州,341000)

**摘要** 采用壳聚糖絮凝与聚酰胺吸附相结合的方法纯化甜叶菊废渣乙醇提取液中的黄酮,并优化该工艺的条件。以黄酮纯度为主要考查指标,通过单因素及正交试验进行分析,确立壳聚糖絮凝沉淀法纯化的最佳条件;通过研究聚酰胺粉对甜叶菊废渣黄酮的吸附解吸性能、吸附动力学及等温线、上样浓度、过柱的流速、乙醇洗脱浓度及流速等,建立聚酰胺柱层析纯化法最佳条件。实验表明:壳聚糖絮凝温度 35℃,pH=5,搅拌时间 15 min,壳聚糖溶液加入量 1.0 mL。聚酰胺吸附的上样浓度约为 0.2 mg/mL,流速为 1.5 mL/min,洗脱液为体积分数 60% 乙醇,流速为 1.5 mL/min,最终黄酮纯度达到 53.42%,为醇提物的 6 倍以上。

**关键词** 甜叶菊废渣;黄酮;壳聚糖;聚酰胺;纯化

我国是世界上最大的甜菊糖产品生产供应国,约占全球总产量的 90%<sup>[1]</sup>,其原料甜叶菊中除甜菊糖外,还含有黄酮、萜类、酚类、有机酸等<sup>[2]</sup>。提取甜菊糖后会排出大量废渣,造成资源的浪费,从中提取并纯化天然活性物质是一种很好的解决方式,其中黄酮类化合物因具有降血压血脂、抗氧化、抗癌、抗肿瘤<sup>[3-7]</sup>等功效而产生很好的经济效益,是天然物质研究的热点。关于黄酮类化合物纯化工艺的研究有很多,主要方法有柱层析、絮凝沉淀、膜分离<sup>[8-10]</sup>等。目前大孔树脂<sup>[11]</sup>和聚酰胺<sup>[12]</sup>为吸附剂的柱层析法,大孔树脂的报道最多,但对其吸附理论方面研究不足而导致树脂合成缺乏针对性,吸附选择性较差<sup>[13]</sup>。而聚酰胺的酰胺基吸附、“氢键吸附”<sup>[14]</sup>等机理证明其对黄酮等酚类化合物有独特的选择性,但因对鞣质等含大量酚羟基的物质因不可逆吸附而不易回收<sup>[15]</sup>等问题使得黄酮提纯工艺中的应用相对较少,用其纯化甜叶菊废渣黄酮则鲜有报道。本文采用壳聚糖絮凝剂先除去废渣醇提物中的一些杂质<sup>[16]</sup>,再用聚酰胺粉纯化黄酮,并优化了各阶段的工艺条件,分析了聚酰胺吸附性能机理。解决了聚酰胺粉再生困难费时的问题,使得工艺可连续过柱进行,大大降低工艺成本,提升工艺的流畅性和效率,大幅提升黄酮纯度。

第一作者:硕士,教授(方浩斌为通讯作者,E-mail:wwwfhhb@126.com)。

\*国家自然科学基金资助项目(51364014);江西省科技厅资助项目(2013BBG70003);2013 年江西省级大学生创新创业训练计划项目(201310407037,201310407057);2014 年度江西省普通本科高等学校专业综合改革试点项目(赣教高字(2014)43 号)

收稿日期:2015-01-14,改回日期:2015-02-25

## 1 材料与方法

## 1.1 主要仪器与试剂

UV-2550 紫外可见分光光度计,日本岛津;BS223S 型电子分析天平,德国 Sartorius;85-2 数显恒温磁力搅拌器,江苏金坛市中大仪器厂;DHG-9140 型电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;RE-52AA 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;A11 基本型生物研磨机,德国 IKA。

甜叶菊废渣(江西省赣州市某公司),芦丁对照品(纯度≥98%,贵州迪大科技有限责任公司),聚酰胺粉(60~100 目,浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),壳聚糖(上海伯奥生物科技有限公司,脱乙酰度≥90.0%),无水乙醇、NaOH、Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、NaNO<sub>2</sub>等均作为分析纯。

## 1.2 实验方法

## 1.2.1 标准曲线的绘制

取 10.0 mg 芦丁对照品,体积分数(下同)95%的乙醇溶解定容至 50 mL,分别取 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 50 mL 容量瓶,按 Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>法显色<sup>[17]</sup>,在 500 nm 处测定各自吸光度。制作标准曲线。

## 1.2.2 甜叶菊废渣醇提物的制备

按文献条件提取<sup>[18]</sup>,得到的固体溶于 95% 乙醇,按硝酸铝法测定,得出提取物中黄酮纯度为 8.15%。称取一定量提取物,用 95% 乙醇溶解,配成 1.0 mg/mL 的提取液。

## 1.2.3 壳聚糖纯化条件的优化

取 0.1 g 壳聚糖溶于 100.0 mL 体积分数 1% 乙酸溶液,配成 0.1% 的壳聚糖溶液。

每次取提取液 50.0 mL 于 100 mL 锥形瓶,分别改变壳聚糖溶液加入量,搅拌时间,絮凝温度、pH 值,静置 10 h,纯化液在 3 000 r/min 下离心,过滤得滤液,95% 乙醇补定至 50 mL 容量瓶,取 5.0 mL 测定黄酮浓度,余下 45.0 mL 液体 80 ℃ 烘干称重,黄酮纯度计算:

$$W/\% = \frac{c \times V}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $W$  为黄酮纯度,%;  $c$  为测定黄酮浓度,mg/mL;  $V$  为待烘干液体体积,mL;  $m$  为烘干后得到的固体质量,mg。

#### 1.2.4 聚酰胺吸附和解吸性能

将聚酰胺粉放在 95% 乙醇中煮沸 1 h,甩干,重复 3 次。取上述聚酰胺 2.0 g 于 100 mL 锥形瓶,加入 0.5 mg/mL 的初纯液 50.0 mL,25 ℃ 下恒温搅拌至吸附平衡。取 5.0 mL 测定黄酮浓度,计算吸附量和吸附率。

将上述吸附平衡的聚酰胺粉过滤并用蒸馏水洗涤甩干后,置于 100 mL 锥形瓶,加入 95% 的乙醇 50.0 mL,25 ℃ 下恒温搅拌至解吸平衡,取 5.0 mL 测定,计算解吸率:

$$Q_e = (c_0 - c_e) V_e / m \quad (2)$$

$$E/\% = [(c_0 - c_e) / c_0] \times 100 \quad (3)$$

$$D/\% = [c_d V_d / (c_0 - c_e) V_e] \times 100 \quad (4)$$

式中:  $Q_e$  为平衡吸附量,mg/g;  $c_0$  为起始黄酮浓度,mg/mL;  $c_e$  为吸附平衡时黄酮浓度,mg/mL;  $c_d$  为解吸液黄酮浓度,mg/mL;  $V_e$  为平衡时溶液体积,mL;  $V_d$  为解吸液体积,mL;  $m$  为聚酰胺质量,g;  $E$  为吸附率;  $D$  为解吸率。

#### 1.2.5 吸附动力学曲线及等温线测定

取 0.5 mg/mL 的初纯液按上述过程吸附,每隔 20 min 测定 1 次至吸附平衡,按(2)式计算吸附量,做时间与吸附量关系图,并用 Langmuir 吸附速率方程拟合动力学曲线。

分别取不同浓度提取液按上述过程吸附,测定吸附平衡时的浓度,按(3)式计算吸附率,做浓度与吸附率关系图,用 Langmuir 方程和 Freundlich 方程拟合等温线。

$$\ln[Q_e / (Q_e - Q_t)] = Kt + m \quad (5)$$

$$c_e = Q_{\max} c_0 / Q_e - 1/k \quad (6)$$

$$\ln(Q_e) = (1/n) \ln(c_e) + \ln(a) \quad (7)$$

式中:  $c_e$ 、 $Q_e$  同上;  $t$  为时间,min;  $Q_t$  为  $t$  时刻吸附量,mg/g;  $Q_{\max}$  为理论最大吸附量,mg/g;  $K$ 、 $k$ 、 $m$ 、 $a$  皆为常数。

#### 1.2.6 柱层析穿透曲线

采用湿法装柱,将预处理过的聚酰胺粉装入(10 × 400) mm 玻璃层析柱,直至柱高 25 cm,取 0.5 mg/mL 初纯液以约 1.0 mL/min 的流速连续过柱,开始每 10 min 测定 1 次,以时间和吸光度为坐标作穿透曲线。得到穿透点。

#### 1.2.7 过柱吸附条件的优化

将 0.5 mg/mL 的初纯液以不同的流速过柱,至吸附平衡,测定黄酮浓度,按(3)式计算吸附率,作流速与吸附率的关系图,得最佳流速。

取不同浓度的初纯液分别在 1.0 mL/min 的流速下过柱,吸附至平衡,测定黄酮浓度,按(3)式计算吸附率,作黄酮浓度与吸附率的关系图,得最佳上样浓度。

#### 1.2.8 过柱解吸条件的优化

将吸附平衡后的聚酰胺柱用蒸馏水过柱洗至流出液几乎无色,依次用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、无水乙醇在 1.0 mL/min 的流速下过柱洗脱,各收集约 100 mL 液体,直接紫外扫描得到 200 ~ 600 nm 的光谱图,选取最佳的洗脱液浓度。

分别在不同流速下,用最佳浓度的乙醇洗脱,各收集 100.0 mL 液体,取 5.0 mL 测定,按(4)式计算解吸率。作流速与解吸率的关系图,选取最佳流速。

#### 1.2.9 聚酰胺柱再生性能实验

按上述过程及选定条件纯化甜叶菊废渣黄酮,收集 100.0 mL 纯化液,取 5.0 mL 测定黄酮浓度,余下液体 80 ℃ 烘干称重,按(1)式计算黄酮纯度。

用质量分数 4% 的 NaOH 在 1.5 mL/min 的流速下洗柱至流出液几乎无色,再用体积相近的 4% HCl 在相同流速下洗柱,最后水洗至流出液接近中性,用得到的再生聚酰胺柱进行纯化,计算吸附率与纯度。按相同过程及条件重复多次,作再生次数与黄酮吸附率、纯度的关系图。

## 2 结果与分析

### 2.1 芦丁标准曲线

标准曲线如图 1。通过线性拟合得到吸光度和浓度的线性回归方程:  $Y = 13.42X + 0.002$ ,  $R^2 = 0.9995$ 。浓度 0.002 ~ 0.024 mg/mL 内线性关系良好。

### 2.2 壳聚糖纯化工艺条件初步优选

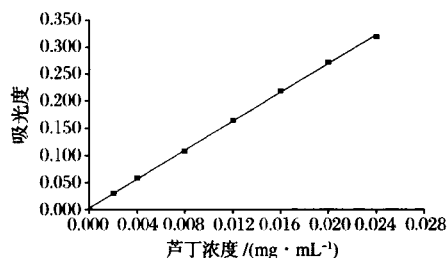


图1 芦丁标准曲线

Fig. 1 Rutin calibration curve

按 1.2.3 步骤进行单因素实验,各因素对黄酮纯度的影响如表 1 所示。

由单因素实验结果初步得到合适的工艺条件如下:0.1%的壳聚糖乙酸溶液加入量为 1.5 mL,搅拌时间为 15 min,温度为 35 ℃,pH 值为 5。

表 1 单因素实验结果  
Table 1 Result of the single test

因素	实验结果					
壳聚糖加入量/mL	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
黄酮纯度/%	12.96	15.43	15.69	14.00	13.37	12.90
搅拌时间/min	0	5	10	15	20	25
黄酮纯度/%	10.8	11.05	12.21	12.35	11.26	10.11
温度/℃	25	30	35	40	45	50
黄酮纯度/%	11.08	12.73	15.04	13.52	11.82	10.19
pH 值	3	4	5	6	7	8
黄酮纯度/%	9.36	10.45	10.65	7.32	6.26	4.10

## 2.3 壳聚糖纯化废渣提取物正交实验

### 2.3.1 正交实验设计

以 2.1 条件为因素,设计  $L_9(3^4)$  正交实验(表 1),结果如表 2、表 3 所示。

由表 2 极差可知,各因素影响程度顺序  $\text{pH} > \text{温度} > \text{壳聚糖加入量} > \text{搅拌时间}$ ,以极差最小值作为误差项<sup>[20]</sup>,由表 3 可知,pH 值对纯度影响非常显著,其他影响较小。综合考虑,纯化 50 mL 浓度为 1.0 mg/mL 的废渣乙醇提取液的条件为搅拌时间 15 min,温度 35 ℃,0.1%的壳聚糖溶液 1.0 mL,pH 值为 5。按上述条件进行多次验证,最终初纯物平均纯度为 18.16%。

表 1  $L_9(3^4)$  正交实验设计表  
Table 1  $L_9(3^4)$  design of orthogonal experiment

水平	pH 值	搅拌时间/min	温度/℃	壳聚糖加入量/mL
1	3	10	30	1.5
2	4	15	35	2.0
3	5	20	40	2.5

表 2 正交实验结果

Table 2 result of orthogonal experiment

实验号	pH 值	搅拌时间/ min	温度/ ℃	壳聚糖加入量/ mL	黄酮纯度/ %
1	3	10	30	1.0	7.10
2	3	15	35	1.5	7.71
3	3	20	40	2.0	7.10
4	4	10	35	2.0	13.29
5	4	15	40	1.0	13.63
6	4	20	30	1.5	13.31
7	5	10	40	1.5	17.33
8	5	20	35	1.0	18.78
9	5	15	30	2.0	17.11
均值 1	21.91	37.72	37.52	39.51	
均值 2	40.86	38.54	39.78	38.35	
均值 3	53.22	39.19	38.06	37.50	
极差	31.31	1.47	2.26	2.01	

表 3 方差分析表

Table 3 Variance analysis

因素	离差平方和	自由度	F 值	$F_{0.05}(2,8)$	显著性
pH 值	181.993 3	2	505.26	4.46	**
搅拌时间	0.3603	2	1.00	4.46	
温度	0.9286	2	2.58	4.46	
壳聚糖加入量	0.6787	2	1.88	4.46	

## 2.4 聚酰胺层析柱进一步纯化黄酮

### 2.4.1 聚酰胺吸附解吸性能及等温线曲线

吸附解吸率与黄酮浓度关系如图 6 所示;吸附等温线如图 7 所示。将图 7 数据代入(6)与(7)式,分别进行拟合,得到 Langmuir 方程和 Freundlich 方程的线性拟合如图 8、图 9 所示。

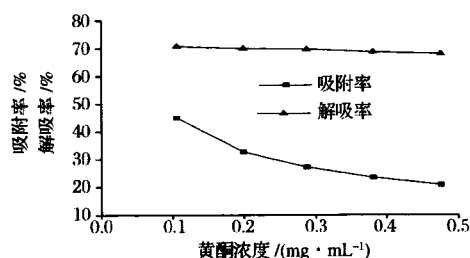


图 6 吸附解吸率与黄酮浓度关系

Fig. 6 The relationship between adsorption or desorption rate

由图 6 可知,吸附率随浓度上升而下降,故待纯化黄酮浓度不宜过大。

由图 8 得到 Langmuir 方程为  $c_e = 49.819c_e/Q_e - 1.191$ ,  $R^2 = 0.9978$ , 线性关系良好,根据方程得到聚酰胺粉对黄酮最大吸附量的理论值为 49.819 mg/g,该

值越大表明吸附剂越容易吸附黄酮,结果非常可观。

由图 9 得到 Freundlich 方程为  $\ln(Q_e) = 0.393\ln$

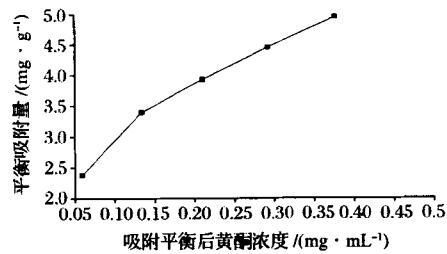


图 7 吸附等温曲线

Fig. 7 Adsorption isothermal curve and concentration

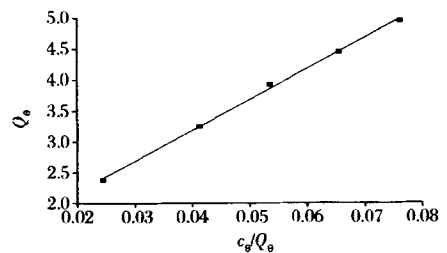


图 8 Langmuir 方程线性拟合图

Fig. 8 Linear fitting of Langmuir equation

$(c_e) + 1.978, R^2 = 0.9995$ , 线性关系良好根据方程得到系数  $1/n$  为 0.393, 在 0.1 ~ 0.5 之间, 表明聚酰胺粉容易吸附黄酮<sup>[21]</sup>。

由结果得知, 2 种模型都能较好地模拟聚酰胺吸附性能。Langmuir 模型表征单分子层吸附, 而 Freundlich 模型覆盖范围更大。根据  $R^2$  值可知, 后者能更好地描述吸附性能。故认为聚酰胺粉对甜叶菊废渣黄酮的吸归属于中等程度覆盖率的单分子层吸附<sup>[22]</sup>。

2.3.2 聚酰胺吸附动力学

吸附量与吸附时间的关系如图 10 所示。大约在 2h 达到平衡。选取图 10 中前 5 个数据, 按(5)式计算, 进行吸附动力学线性拟合, 如图 11 所示。拟合得到方程为:  $\ln[Q_e/(Q_e - Q_t)] = 0.0469t - 0.620$ ,  $R^2 = 0.997$ , 线性关系良好。2 h 内吸附达到平衡且线性关系良好的吸附剂属于快速吸附型<sup>[23]</sup>。

2.3.3 柱层析穿透曲线

穿透曲线如图 12 所示。约 40 min, 即流出 40 mL 液体后, 吸光度明显大于零, 即开始有黄酮流出, 此为穿透点, 吸附已开始达到饱和。此时浓度为 0.0175 mg/mL, 原液黄酮浓度为 0.103 mg/mL, 吸附率 83.01%。为确保聚酰胺完全吸附饱和, 实际过柱

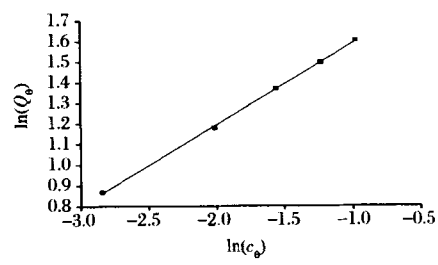


图 9 Freundlich 方程线性拟合图

Fig. 9 Linear fitting of Freundlich equation

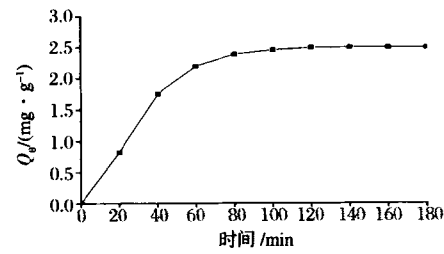


图 10 吸附量与时间的关系

Fig. 10 The relationship between adsorption quantity and time

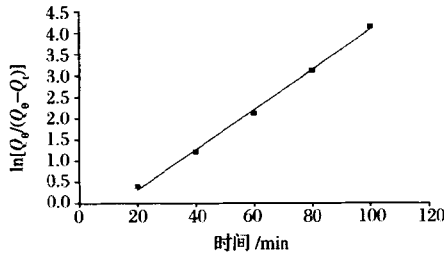


图 11 吸附动力学方程线性拟合图

Fig. 11 Linear fitting of adsorption kinetics equation

液体应略微过量。本实验确定过柱液体体积 50 mL。

2.3.4 上样浓度及流速的选择

上样浓度及流速分别对应吸附率关系见图 13、图 14。吸附率随样液浓度及流速的增加大致呈下降趋势, 故选取黄酮浓度约为 0.2 mg/mL, 流速为 1.5 mL/min。

2.3.5 乙醇洗脱浓度的选择

各浓度乙醇与对应洗脱物的紫外光谱如图 15 ~ 图 18。大多数黄酮由于苯甲酰基和桂皮酰基体系的电子跃迁在 240 ~ 285 nm 和 300 ~ 400 nm 都有吸收峰<sup>[19]</sup>。由图 15 ~ 图 18 可知, 60% 乙醇洗脱能明显检测到黄酮类物质。30%、40% 乙醇洗脱物 210 nm 处的吸收峰可能为溶剂峰, 50% 乙醇洗脱物的峰值不明显, 70% 以上乙醇洗脱物在 510 nm 和 410 nm 处的吸收峰可能为杂质峰。故洗脱乙醇浓度为 60%。

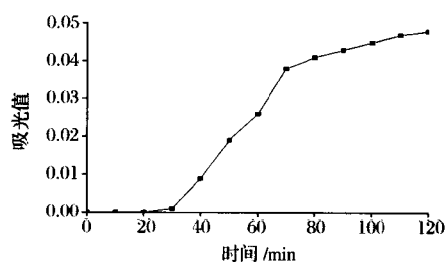


图 12 吸附穿透曲线

Fig. 12 Adsorption breakthrough curve

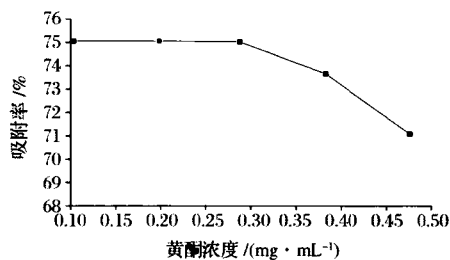


图 13 上样浓度与吸附率关系

Fig. 13 The relationship between sample concentration and adsorption rate

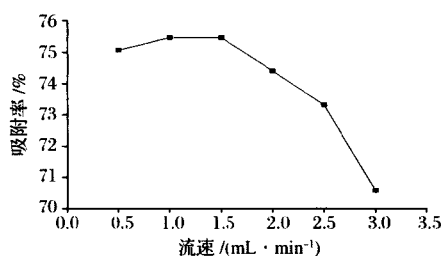


图 14 流速与吸附率的关系

Fig. 14 The relationship between velocity and adsorption rate

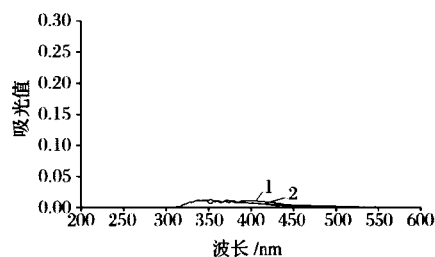


图 15 10%、20% 乙醇洗脱物紫外光谱

Fig. 15 10% and 20% Ethanol elution ultraviolet spectrum

### 2.3.6 洗脱速度的选择

洗脱速度与解吸率的关系见图 19。流速大于 1.5 mL/min 时解吸率开始下降, 故选 1.5 mL/min 较为合适。

### 2.3.7 聚酰胺再生性能的测定

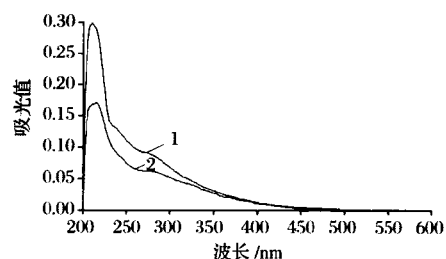


图 16 30%、40% 乙醇洗脱物紫外光谱

Fig. 16 30% and 40% Ethanol elution ultraviolet spectrum

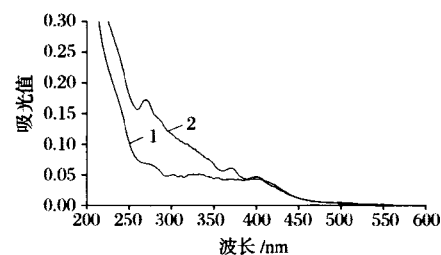


图 17 50%、60% 乙醇洗脱物紫外光谱

Fig. 17 50% and 60% Ethanol elution ultraviolet spectrum

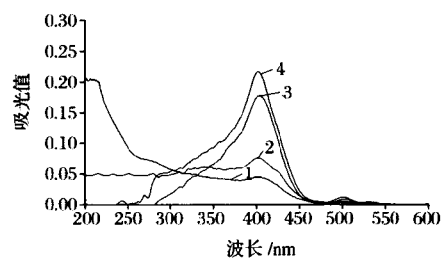


图 18 70%、80%、90%、无水乙醇洗脱物紫外光谱

Fig. 18 70%, 80%, 90% and absolute ethanol elution ultraviolet spectrum

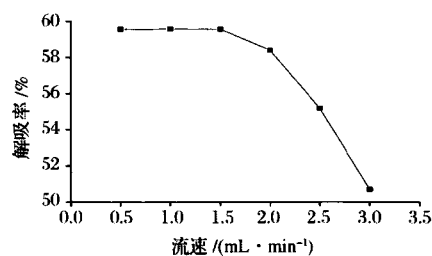


图 19 解吸率与洗脱速度的关系图

Fig. 19 The relationship between desorption rate and velocity

用浓度约为 0.2 mg/mL 的黄酮液约 50 mL 上柱, 吸附流速为 1.5 mL/min, 洗脱液为 60% 的乙醇, 解吸流速为 1.5 mL/min, 洗脱至无色 (需约 100 mL 洗脱液)。计算得到黄酮平均纯度为 53.42%。

再生聚酰胺柱时使用的酸碱量分别都约为 200

mL,用该柱按上述条件纯化,重复多次。再生次数与吸附率、黄酮纯度的关系如图 20、图 21 所示。重复使用 6 次使得聚酰胺的性能似乎略有下降,但吸附率和黄酮纯度仍保持在 70% 和 50% 以上。故认为至少可连续再生 6 次。

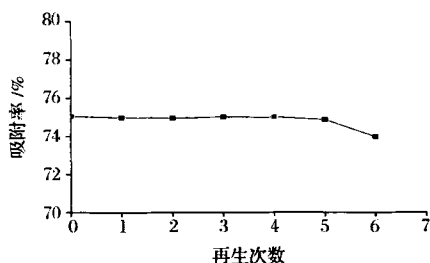


图 20 再生次数与吸附率关系

Fig. 20 The relationship between regeneration times and absorption rate

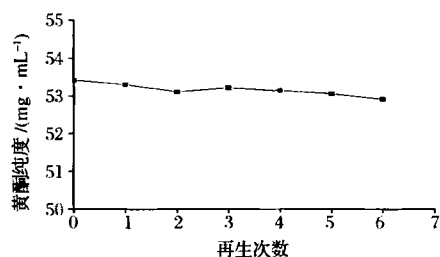


图 21 再生次数与黄酮纯度关系

Fig. 21 The relationship between regeneration times and absorption rate

### 3 结论

本实验采用壳聚糖絮凝与聚酰胺吸附相结合的方法纯化甜叶菊废渣乙醇提取液中的黄酮。先以黄酮纯度为主要指标,考察了多个壳聚糖絮凝的影响因素,通过正交分析,优化壳聚糖絮凝沉淀法的纯化条件:在 1.0 mg/mL 提取物中加入 0.1% 壳聚糖溶液 1.0 mL,壳聚糖絮凝温度 35 ℃,pH = 5,搅拌时间 15 min;分析了聚酰胺粉对甜叶菊废渣黄酮的吸附解吸性能、吸附动力学及等温线,优化了聚酰胺纯化法的工艺条件:上样浓度为 0.2 mg/mL,流速为 1.5 mL/min,洗脱液为 60% 乙醇,流速为 1.5 mL/min,黄酮纯度达到 53.42%,结果非常可观,达到一些工业产品的纯度需求。

该工艺解决了聚酰胺再生困难的问题,且壳聚糖本身投入量极低,大大降低了成本。再生过程无需长时间浸泡,而以洗脱的方式进行,大大提高工艺连续

性和效率,易于操作,可用于纯化甜叶菊废渣黄酮。

### 参 考 文 献

- [1] 卢占军,刘先春,易龙,等. 利用甜叶菊渣为主要原料制备发酵饲料的研究[J]. 饲料工业,2011,32(13):58-61.
- [2] Wollwer-Rieck U. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(4): 886-895.
- [3] QIN L Q, XU J Y, WANG P Y, et al. Soyfood intake in the prevention of breast cancer risk in women: a meta-analysis of observational epidemiological studies[J]. J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo), 2006, 52(6): 428-436.
- [4] TimCushnie T P, Andrew J Lamb. Antimicrobial activity of flavonoids [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 26: 343-356.
- [5] 于长青,张丽萍,王宪青. 麦胚黄酮抗动脉粥样硬化体内机制的研究[J]. 中国粮油学报,2005,20(5): 27-30.
- [6] 陈士票,费晓伟,周新妹. 菊米提取物总黄酮对自发性高血压大鼠的降血压效果观察[J]. 嘉兴学院学报,2011,23(3):56-59.
- [7] LIN Y, Vermeer M A, Bos W, et al. Molecular structures of citrus flavonoids determine their effects on lipid metabolism in HepG2 cells by primarily suppressing apoB secretion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(9): 4 496-4 503.
- [8] 陈丛瑾. 柱色谱法分离纯化黄酮类化合物研究进展[J]. 西北药学杂志,2011,26(2):150-153.
- [9] 唐浩国,李叶,向进乐,等. 超滤分离纯化麻竹叶黄酮的研究[J]. 食品科学,2008,29(5):177-180.
- [10] 何德飞,苏印泉. 无机絮凝剂纯化杜仲叶水提液条件优化研究[J]. 西北林学院学报,2014,29(2):202-206.
- [11] 郭飞,胡晓旭,雷红菲,等. 大孔吸附树脂纯化无柄金丝桃茎部总黄酮工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26:1 853-1 857.
- [12] 林春梅. 聚酰胺层析法分离纯化牛蒡叶中的总黄酮[J]. 食品与发酵工业,2014,40(2):236-238.
- [13] 姜嵩,刘永峰,白清清,等. 大孔吸附树脂的吸附机理[J]. 化学进展,2012,24(8):1 427-1 436.
- [14] 严希康. 生化分离工程[M]. 北京:化学工业出版社,2001:256-258.
- [15] 吴立军. 天然药物化学(第五版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:31-32.
- [16] 孙星,盛华刚,张超,等. 壳聚糖絮凝沉降法对葛根芩

- 连汤中黄酮和生物碱类成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 12-16.
- [17] 聂继云, 吕德国, 李静, 等. 分光光度法测定苹果果实总黄酮含量的条件优化[J]. 果树学报, 2010, 27(3): 466-470.
- [18] 史高峰, 王红玉, 王国英, 等. 甜叶菊渣中总黄酮的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 62-64.
- [19] 张培成. 黄酮化学. 北京: 化学工业出版社, 2008: 227, 239-240.
- [20] 蔡碧琼. 稻壳黄酮类化合物的提取、精制及抗氧化活性研究[D]. 福建: 福建师范大学, 2008: 27.
- [21] ZHANG Bin, YANG Rui-yuan, ZHAO Yan, et al. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 867(2): 253-260.
- [22] 傅献彩, 沈文霞, 姚天扬, 等. 物理化学(第五版)下册[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 360-364.
- [23] 张静. 银杏黄酮纯化及生物活性的研究[D]. 江苏: 江南大学, 2010: 29.

## Process of purifying the flavonoids by chitosan and polyamide from waste residue of *Stevia rebaudiana*

LUO Xu-yan, FANG Hao-bin, ZHAO Dong-fang, HUANG Rui-yu

(College of metallurgical and chemical engineering, Jiangxi University of Science and technology, Ganzhou 341000, China)

**ABSTRACT** The purification and extraction of flavonoids by chitosan and polyamide from waste residue of *Stevia rebaudiana* ethanol solution and optimization of purification were studied. With flavonoids purity as the index, we analyzed the chitosan flocculation by single test and orthogonal test. The polyamide purification process was studied by the properties of the adsorption, desorption, the adsorption kinetics and isotherm. The optimum condition was obtained by comparing the different sample concentration, absorption velocity, ethanol concentration and velocity for desorption. The results showed that the appropriate conditions of the process were as follow: the sample was stirred for 15 min with 1.0 mL chitosan solution at 35 °C and pH 5. The sample concentration for absorption by polyamide was about 0.2 mg/mL and the velocity was 1.5 mL/min. The desorption was 60% ethanol at 1.5 mL/min. The purity were 53.42%, increased about more than 5 times. This progress solve the problem of hard to reuse polyamide, reduce the cost greatly, and can be used to pure the flavonoids extracted from *Stevia Rebaudiana* waste residue.

**Key words** waste residue of *Stevia rebaudiana*; flavonoids; chitosan; polyamides; purification